

# 膵癌のEpithelial-Mesenchymal Transitionに対するPeriostinの作用

著者	菅野 敦
号	77
学位授与番号	2548
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/45757">http://hdl.handle.net/10097/45757</a>

氏 名（本籍）	菅 野 敦 <sup>かん の あつし</sup>
学 位 の 種 類	博 士（医 学）
学 位 記 番 号	医 博 第 2 5 4 8 号
学位授与年月日	平 成 20 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 （博士課程）医科学専攻
学 位 論 文 題 目	膵癌の Epithelial-Mesenchymal Transition に 対する <i>Periostin</i> の作用

（主 査）

論 文 審 査 委 員	教授 下瀬川 徹	教授 笹 野 公 伸
	教授 海 野 倫 明	

# 論文内容要旨

## (背 景)

*Periostin* は osteoblast-specific factor 2 として同定され、骨や歯牙、血管の形成に重要な役割を果たす分泌蛋白である。また、*periostin* は TGF  $\beta$  や BMP 2 によって誘導され細胞接着や増殖に重要な働きをする分子として注目されている。私は、*periostin* が細胞接着に重要な役割を果たすことから、Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) と関連する分泌蛋白であると推測した。実際癌化にも関与しているとの報告が散見されるが、その働きは癌細胞に対し Akt/PKB pathway を介して増殖の働きを呈すとの報告や、逆に足場非依存性増殖を抑制するという報告もあり見解が一致していない。

## (目 的)

膀胱における *periostin* の発現、機能、ならびに EMT への関連を明らかにすること。

## (方 法)

(1) *Periostin* 特異的抗体を用いて免疫染色を行い膀胱等における *periostin* の分布を明らかにすること。(2) 各種膀胱細胞株、各種大腸癌細胞株、線維芽細胞株 (KMST1)、血管内皮細胞 (HUVEC)、ヒト膀胱星細胞 (PSC) における mRNA の発現を RT-PCR, real time PCR を用いて確認、蛋白の発現を Western blot にて確認すること。(3) *Periostin* と PSC の局在を調べるため *periostin* と  $\alpha$  SMA の特異抗体を用いて二重蛍光染色を行うこと。(4) 新鮮凍結標本から Laser Capture Microdissection (LCM) を用いて癌部と周囲間質の細胞群をそれぞれ削りだし、その RNA を抽出し、*periostin* の発現検討を mRNA level で行うこと。(5) 膀胱細胞が PSC の *periostin* 分泌へ及ぼす影響を調べるため、膀胱細胞株 Panc1 と不死化した rat-PSC (SIPS) を共培養し、ラット特異的な primer を用いて SIPS における *periostin* 発現の変化を調べること。(6) 293T 細胞に *periostin* 発現 vector を導入し、その細胞上清で Panc1 の移動能を wound healing assay で検討すること。(7) *Periostin* の膀胱細胞における影響を調べるため、*periostin* 発現 vector を用いて Panc1 の *periostin* 安定発現株 (PP1) を樹立すること。(8) PP1 と Panc1 を用いて機能解析を行うこと。(9) 免疫蛍光染色 と Western blot を用い上皮系ならびに間葉系マーカーの発現を調べること。(10) Panc1 と PP1 をヌードマウスの皮下に移植し増殖能を検討すること。(11) Panc1 と PP1 をヌードマウスの膀胱に同所移植しその転移能を検討すること。

## (結 果)

(1) *Periostin* の特異抗体を用い、各種組織の免疫染色を行ったところ癌腺管および正常腺管には発現を認めず、線維化を伴う周囲間質部に強い発現を認めた。(2) 膵癌細胞株、大腸癌細胞株、線維芽細胞株では *periostin* の発現はほとんど認めないが、HUVEC および *PSC* で *periostin* の発現を認め、real time PCR において *PSC* における発現が特に高いことが明らかになった。(3) 二重蛍光染色において癌腺管周囲に *periostin* と  $\alpha$ SMA が共発現していた。(4) LCM を用いた組織上の mRNA 発現の検討では、*periostin* は癌で発現が少なく癌周囲間質で強く発現していた。(5) Panc1 と SIPS を共培養すると、SIPS における *periostin* の mRNA 発現が増加した。(6) *Periostin* が含まれた細胞上清で Panc1 を培養すると、その移動能が低下した。(7) *Periostin* 強制発現の Panc1 stable cell line (PP1) を樹立した。(8) PP1 と Panc1 を用いて機能解析を行ったところ、PP1 において細胞増殖能と足場非依存性増殖に明らかな変化は認めなかったが、形態は Panc1 で見受けられるような紡錘形の間葉系様細胞が消失し、細胞間が密な立方状敷石状の上皮様形態へと変化した。また、wound healing scratch assay, migration assay において PP1 の移動能の低下を認めた。(9) PP1 において上皮系マーカー (E-cadherin,  $\beta$  catenin) の発現上昇、間葉系マーカー (N-cadherin, Vimentin) の発現低下を認めた。(10) ノードマウスの皮下移植で PP1 の増殖能は抑制され、(11) また脾の同所移植でも PP1 の肝臓への転移は抑制された。

## (結 論)

*Periostin* の発現は癌細胞にみられず、*PSC* で高発現していた。また、その強制発現によって EMT が抑制され、ノードマウスにおける *in vivo* の実験においても増殖能、転移能が抑制された。すなわち *PSC* から分泌される *periostin* により膵癌の EMT が抑制されている可能性が示された。

## 審査結果の要旨

我々は、癌が転移を来す最初の過程に癌細胞でみられる細胞間接着が弛緩し、上皮の性質が消失し、間葉系の性質を獲得し移動能を示す現象である上皮間葉形質転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) について研究を重ねてきた。Periostin は細胞接着に重要な役割を担う分泌蛋白として同定され、近年癌においてもその役割が報告されているが、膵癌における役割は明らかではない。私は、periostin が細胞接着と関連があることから上皮間葉形質転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) と関連し癌の転移に重要な役割を担う分泌蛋白ではないかと推測し、膵癌における periostin の役割を研究した。免疫染色、免疫蛍光染色において、膵癌細胞には periostin の発現は認めず、その周囲間質で強い発現を認めた。Laser Capture Microdissection を用いた膵癌組織中 mRNA 発現の検討では、同様に *periostin* は癌細胞で発現せず、周囲間質で強く発現していた。各種癌細胞、並びに膵星細胞 (pancreatic stellate cell: PSC) の *periostin* 発現を RT-PCR にて調べたところ、癌細胞では発現を認めず、PSC で強い発現を認めた。Periostin を含んだ細胞上清で膵癌細胞株 Panc1 を培養し、wound healing scratch assay を施行したところ、Panc1 の細胞移動能が低下した。また、rat から分離した PSC と Panc1 を共培養した結果、PSC における *periostin* の mRNA 発現が増強され、膵癌細胞と PSC が相互に作用していることが示された。Periostin の機能を解析するため、Panc1 に *periostin* 発現ベクターを導入し、強制発現株 (PP1) を作成した。PP1 は、細胞形態が Panc1 本来の間葉系細胞様の紡錘形の形態から立方形状敷石状の上皮様形態へと変化していた。また、この細胞株では上皮系マーカー (E-cadherin,  $\beta$ -catenin) の発現亢進と、間葉系マーカー (vimentin, N-cadherin) の発現減弱を認め、EMT が抑制されていた。さらに、PP1 はコントロール細胞と比べ、*in vitro* における細胞移動能の低下、ヌードマウスの皮下移植における増殖能の低下、ヌードマウスの膵への同所移植の転移能の低下を示すことが確認された。これらの結果から、periostin は膵癌細胞株との相互作用によって PSC から分泌が誘導され、膵癌細胞の EMT を制御し転移を抑制する可能性が示された。

本論文の内容は、最終審査終了時点で、第一次審査において指摘された不備が適切に修正されており、審査の結果、本論文内容が十分学位に値することが確認された。よって、本論文は博士 (医学) の学位論文として合格と認める。